



TITLE:

# シアノバクテリア概日時計におけるKaiタンパク質間相互作用動態の解析( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

合田, 和史

CITATION:

合田, 和史. シアノバクテリア概日時計におけるKaiタンパク質間相互作用動態の解析. 京都大学, 2015, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r12915>

RIGHT:

本学位論文はTHE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY誌とBioscience, Biotechnology, and Biochemistry誌に掲載された2編の学術論文の内容に基づき書かれたものである。; This research was originally published in THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. Kazuhito Goda, Hiroshi Ito, Takao Kondo, and Tokitaka Oyama. Fluorescence correlation spectroscopy to monitor Kai protein-based circadian oscillations in real time. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 2012. 287:3241-3248. c the American Society for Biochemistry and Molecular Biology. Effects of adenylates on the circadian interaction of KaiB with the KaiC complex in the reconstituted cyanobacterial Kai protein oscillator. Kazuhito Goda, Takao Kondo, and Tokitaka Oyama. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2014 78:1833-1838(<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09168451.2014.940833>)

( 続紙 1 )

京都大学	博 士（理 学）	氏 名	合田和史
論文題目	シアノバクテリア概日時計におけるKaiタンパク質間相互作用動態の解析		
(論文内容の要旨)			
<p><i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942は細胞レベルの概日時計研究に適した単細胞性のシアノバクテリアである。分子遺伝学的な解析から、<i>kaiA</i>、<i>kaiB</i>、<i>kaiC</i>の3遺伝子が概日時計の成立に必須であり、試験管内においてKaiA、KaiB、KaiCの3つのタンパク質とATPの存在下でリン酸化KaiCタンパク質の比率が概日振動することが示された。試験管内に再構成したKaiタンパク質振動体は概日時計の特徴である「自律的な概日振動」、「温度補償性」、「外部環境への同調」を示すことから概日時計の中心的振動体であると考えられ、その解析を通して細胞レベルの概日時計の分子機構が解明できると期待されている。Kaiタンパク質振動体では、KaiCタンパク質の持つATPase活性、自己リン酸化活性、自己脱リン酸化活性とKaiタンパク質間相互作用が協調して働き、概日時計の特徴を産み出すと考えられている。KaiBタンパク質はリン酸化KaiCタンパク質に優先的に相互作用し、リン酸化状態のスイッチとして働く。従来のKaiタンパク質間相互作用はゲルろ過や免疫沈降法、Native-PAGE等の方法で検出されていたが、どれも多段階の実験ステップが必要であり、高い時間分解能を持ち数理解析可能なデータを得ることを妨げていた。そこで本研究では、Kaiタンパク質間相互作用の働きを解明するため、Kaiタンパク質振動体におけるKaiBタンパク質とKaiCタンパク質複合体の相互作用を蛍光相関分光法によりリアルタイムモニタリングする方法の開発に取り組んだ。</p> <p>最初に、部位特異的標識技術を用いてKaiBタンパク質に均一な蛍光標識を施した。蛍光標識KaiBタンパク質は再構成溶液に添加しても、リン酸化KaiCタンパク質比率の概日リズムに影響を与えなかった。蛍光相関分光法による解析を行ったところ、5日以上の間、相互作用に由来する並進拡散時間の概日リズムを検出することに成功した。この方法は、定量的で非侵襲的なモニタリング法としてKaiタンパク質の相互作用の機能解明に重要なツールとなることが期待される。</p> <p>次に、本モニタリング法を用いて「外部環境への同調」における周期的な相互作用の動態を観測した。Kaiタンパク質振動体に高温パルス刺激を与えたところ、相互作用の変動が刺激を与えた時刻に依存して位相応答する様子が観測された。約5日間の相互作用の周期的変動を観測すると同時に刺激直後の位相応答の遷移過程を10分間の短い間隔で観測でき、位相変化が刺激直後に速やかに進行する様子が明らかになった。また、光環境への同調を観測するために、細胞内で光環境の変化に伴い濃度変化するアデニル酸の濃度を再構成溶液中において変化させ、相互作用の変動を検出した。ADP添加後の相互作用の概日リズムにおいて周期長変化と位相応答が生じている事を、定量データを用いた数理解析から明らかにした。</p> <p>以上の通り、本法はKaiタンパク質間相互作用に関する数理解析可能なデータを高い時間分解能で取得できるリアルタイムモニタリング法であり、「外部環境への同調」過程の動態観測に用いることができた。今回得られた知見を基にKaiタンパク質間相互作用の幅広い時間スケールでの挙動とKaiCタンパク質の機能との関係が明らかになり、細胞レベルの概日時計の理解が進むことが期待できる。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

合田和史氏が注目したKaiタンパク質振動体は、単細胞性シアノバクテリア由来のKaiA, KaiB, KaiCの3つのタンパク質とATPによって再構成される概日時計の試験管内反応系である。その構成要素の少なさに対して多くの生物の概日時計にも共通して見られる特徴(「自律的な概日振動」、「温度補償性」、「外部環境への同調」)を有することから、細胞レベルでの概日時計を理解する上で基本的且つ重要な課題を含んだモデル実験系であると考えられる。概日時計は約1日の周期を持つ振動を発振する一方で、それより短い時間で変化する入力信号に対して同調し、1日のうちの各時刻で生理的な活性を制御する出力信号を発振する。そのためKaiタンパク質振動体の機能を理解する上で、構成要素であるKaiタンパク質間の相互作用の動態を幅広い時間スケールに跨り解析することは極めて重要な課題である。しかしながら、従来のKaiタンパク質間相互作用の解析は、浸襲的であり手間のかかる解析であった。そこで合田氏は蛍光相関分光法を用いた生体分子解析の経験を活かし、入念な予備検討を行ったうえで、KaiBタンパク質とKaiCタンパク質複合体の相互作用を蛍光相関分光解析法でリアルタイムモニタリングするという方法を着想し、その開発に取り組んだ。

合田氏は蛍光相関分光法のプローブとして、4塩基コドンを用いた部位特異的標識法により蛍光標識KaiBタンパク質を調製した。蛍光相関分光法による観測において、KaiBタンパク質とKaiCタンパク質複合体の相互作用の概日リズムを5日間以上において観測することに成功した。KaiBタンパク質プローブはKaiCタンパク質のリン酸化比率の概日リズムに干渉しなかった上に、この観測系ではレーザー光の繰返し照射についても反応系に光ダメージを与えなかった。これらの結果は、非浸襲なリアルタイムモニタリング法の開発に成功したことを意味し、後に続く幅広い時間スケールに跨った解析に対する有用な方法として提供された。

次に、合田氏は入力信号に対する同調過程を観測するために高温パルス刺激とアデニル酸の添加実験を行った。高温パルス刺激による位相応答に関しては、5日間以上の相互作用の概日リズムと短時間での速やかな位相前進の進行を観測することに成功した。特に、後者の結果は従来の方法では検出することが難しく、本方法の優位性を示している。アデニル酸の添加実験については、本方法の定量性を活かした数理解析を行い細胞の連続暗環境での位相変化との関連を示唆するデータを得ることに成功した。

本研究は、概日時計のモデル反応系に対して、非浸襲的で幅広い時間スケールでタンパク質間相互作用をリアルタイムモニタリングするというユニークな特徴を持つ解析方法を提供するものとして高く評価された。また、本研究で得られた同調過程のタンパク質間相互作用に関する動態の知見は従来の解析方法では見つけることができなかったKaiタンパク質振動体の挙動を示唆するものであり、今後の概日時計研究の発展に寄与するものである。本論文の内容の一部は、*THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*誌及び*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*誌に掲載された。合田氏が実施した研究の質は高く、よって本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成27年1月29日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。